

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年5月31日 (31.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/38553 A1

- (51) 国際特許分類: C12P 7/64, C12N 1/19 // 15/55, 9/20, C10L 1/02, (C12P 7/64, C12R 1:845) (C12P 7/64, C12R 1:865) (C12N 1/19, C12R 1:865)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/08185
- (22) 国際出願日: 2000年11月20日 (20.11.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特 願 平 11/336681
1999年11月26日 (26.11.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 関西化学機械製作株式会社 (KANSAI CHEMICAL ENGINEERING CO., LTD.) [JP/JP]; 〒660-0053 兵庫県尼崎市南七松町2丁目9番7号 Hyogo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 福田秀樹 (FUKUDA, Hideki) [JP/JP]; 〒655-0871 兵庫県神戸市垂水区松風台1丁目8番13号 Hyogo (JP). 野田秀夫 (NODA, Hideo) [JP/JP]; 〒660-0053 兵庫県尼崎市南七松町2丁目9番7号 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 弁理士 南條博道 (NANJO, Hiromichi); 〒530-0047 大阪府大阪市北区西天満3丁目2番9号 翁ビル5階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, JP, KR, US.

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING FATTY ACID LOWER ALCOHOL ESTER

(54) 発明の名称: 脂肪酸低級アルコールエステルの製造方法

(57) Abstract: A process for efficiently producing a fatty acid ester at a low cost which comprises reacting an intact microorganism containing a lipase with a fat or an oil and a liner lower alcohol in a system containing little or no solvent in the presence of water. Since the intact microorganism, which is a microorganism not subjected to any solvent-treatment and the like, is employed as such, it can be easily prepared. As the fat, use may be made of natural fats and oils such as vegetable fats and oils or animal fats and oils or wastes thereof. In the above process, the reaction can proceed even in the presence of water. Therefore, a waste oil containing much moisture is usable as the starting material, which makes it possible to recycle waste oils dumped into the environment and, at the same time, provide a biological diesel fuel with little environmental pollution.

(57) 要約:

微ないし無溶媒系において、水の存在下、リバーゼを含有するインタクトな微生物と油脂と該直鎖低級アルコールとを反応させ、脂肪酸エステルを低コストで、かつ効率よく製造する方法が提供される。インタクトな微生物は、溶媒処理などがなされていない微生物であり、そのまま使用されるので、簡単に調製される。油脂として、植物油脂、動物油脂などの天然油脂、これらの廃油が用いられる。本発明の方法によれば、水の存在下でも反応が進行するので、水分を多く含有する廃油が原料として用いられるため、環境に廃棄される廃油のリサイクルが可能になると同時に、環境汚染の少ないバイオディーゼル燃料が提供される。

WO 01/38553 A1

明 細 書

脂肪酸低級アルコールエステルの製造方法

5 技術分野

本発明は、リパーゼを用いる脂肪酸低級アルコールエステルの製造方法、ならびにその方法に適したリパーゼを含有する微生物に関する。

背景技術

- 10 自動車の燃料として、一般に石油、軽油に代表される化石燃料が用いられている。これらの化石燃料、特にディーゼル自動車に用いられている軽油には、窒素化合物、イオウ化合物が多く含まれているため、ディーゼル自動車などの自動車からは、 CO_2 、 NO_x 、 SO_x などのガスが多量に排出されている。これらの排出ガスは、地球温暖化の原因、環境汚染の原因となっ
- 15 たり、その排出量の削減が緊急の解決課題である。

- この軽油などの化石燃料に代わる燃料として、天然に存在する植物、動物、魚あるいは微生物が生産する油脂を用いる、いわゆるバイオディーゼル燃料が期待されている。これらの油脂のうち、食品製造のために用いられた油脂は環境に廃棄される場合が多く、環境問題を引き起こすので、廃油からの
- 20 バイオディーゼル燃料は、大気汚染の防止と廃油の有効利用の点から、特に期待されている。

- バイオディーゼル燃料としては脂肪酸低級アルコールエステルが好ましく用いられる。油脂から脂肪酸低級アルコールエステルを製造するためには、油脂をグリセリンとそれを構成する脂肪酸とに分離し、ついで、アルコール
- 25 と脂肪酸とからエステルを製造する技術が要求される。その方法の一つとして、リパーゼを用いる脂肪酸エステルの製造研究が種々、行われている。

しかし、現在行われている方法は、もっぱら、油脂を溶媒（例えばヘキサン等）に溶解し、アルコールの存在下、リパーゼと反応させる方法である。この方法では、溶媒から脂肪酸エステルを分離する必要があり、溶媒を回収する操作が必要となつて、プロセスが煩雑になる上、コストも上昇するという欠点に加え、爆発の危険性も含んでいる。そのため、無溶媒系での開発が検討されている。

無溶媒系における実験例としては、JAOCS 73巻、1191～1195頁(1996)に記載がある。この実験によれば、イソプロパノール、イソブタノール、2-ブタノールなどの分岐アルコールを用いた場合は、90%以上の脂肪酸エステルが得られるが、メタノール、エタノール等の工業的に用いられる安価なアルコール類では、脂肪酸エステル化反応がほとんど進行しないことが記載されている。このように、無溶媒系での安価なアルコールを用いる、非エネルギー消費型のバイオディーゼル（脂肪酸エステル）の生産方法は未だ確立されていないのが現状である。

他方で、リパーゼを用いる脂肪酸エステルの合成反応において、リパーゼを単離し、固定化して利用する方法が最もよく検討されている。しかし、この方法ではリパーゼの単離と固定化にコストと時間がかかるという問題がある。

また、微生物菌体自体を用いる検討も行われているが、細胞膜の透過性を考慮する必要が指摘され、アルコールなどの溶媒による微生物の処理が検討されている（例えば、Felixら、Anal. Biochem. 120: 211-234(1982)を参照）。この溶媒処理も、処理および溶媒の回収に時間とコストを要し、かつ爆発のおそれもあるという問題がある。

さらに、リパーゼによるエステル交換反応は、生じる脂肪酸エステルの加水分解を考慮して、非水系で行われており、特に水分を多く含む廃油等を用いる場合には、反応の進行が妨げられるので、水分除去設備が必要となり、

コストが高くなるという問題が生じる。水の存在下、脂肪酸低級アルコールエステルを生産する方法は、特開昭64-10994号公報に記載されている。しかし、この方法は、特殊な酵素を用いなければならず、酵素の単離にもコストと時間がかかるので、実用化されるには至っていない。

- 5 このように、リパーゼを用いるエステル交換反応においては、上記問題のいずれもが解決されておらず、より効率的な脂肪酸エステルの製造方法が求められている。

- 10 本発明は、上記問題点を解決するために行われたものであり、本発明により、メタノール、エタノールなどの安価なアルコールを原料として、リパーゼおよびリパーゼを含有する微生物を細胞膜透過性向上のための処理等を行うことなく（すなわち、インタクトな微生物を用いて）、無溶媒系ないし微溶媒系で、かつ、水分の存在下でも、効率よく脂肪酸エステルが製造される方法が提供される。本発明により、上記課題が一度に解決される。

15 発明の開示

本発明は、微ないし無溶媒系において、水の存在下、リパーゼまたはリパーゼを含有するインタクトな微生物と油脂と直鎖低級アルコールとを反応させることを特徴とする、脂肪酸エステルの製造方法に関する。

- 20 好ましい実施態様においては、前記インタクトな微生物が、多孔質担体に固定されている。

好ましい実施態様では、前記微生物が分泌に関与する配列が欠失した組換えリパーゼを発現し得る微生物である。

また、好ましい実施態様においては、前記水が、反応液中に0.3重量%以上含有される。

- 25 好ましい実施態様においては、前記油脂が、植物油脂、動物油脂、魚油、微生物によって生産される油脂、これらの混合油脂、またはこれらの廃油で

ある。

別の好ましい実施態様においては、前記直鎖低級アルコールがメタノールであり、該メタノールがメタノールと水との合計量に対して30重量%以下となるように調整されている。

- 5 好ましい実施態様においては、直鎖低級アルコールが分割添加される。

さらに、本発明は、分泌に関与する配列を欠失したリパーゼを発現し得るDNA配列を有し、微生物体内にリパーゼを含有し得る組換え微生物に関する。

10 図面の簡単な説明

図1はプラスミドpWI3を出発材料として菌体内にリパーゼを蓄積する遺伝子を有するプラスミドpWI3pmROL7を作成する模式図である。

図2は、プラスミドpWI3pmROL7を有し、菌体内にリパーゼを蓄積するインタクトな固定化酵母を用いて、水の存在下、脂肪酸エステルが製造されることを示す図である。

- 15 図3は、メタノールがメタノールと水との合計量に対して20重量%および32重量%の割合で反応系に含まれる場合の脂肪酸エステル合成を示す図である。

20 発明を実施するための最良の形態

本発明の特徴は、微ないし無溶媒系で、水の存在下、油脂と直鎖低級アルコールとリパーゼとを反応させて脂肪酸エステルを合成するに際し、リパーゼとしてインタクトな微生物を使用する点にある。また、本発明は、この微生物が、分泌に関与する配列が欠失した組換えリパーゼを発現し得る微生物、すなわち菌体内にリパーゼを蓄積する微生物である点にも特徴がある。

- 25 本明細書において、「リパーゼ」とは、グリセリドに作用して、グリセリ

ドをグリセリンまたは部分グリセリドと脂肪酸とに分解する能力を意味する。

「インタクトな微生物」とは、細胞膜の透過性を良くするための処理（例えば、溶媒処理等）を施していない微生物を意味する。単に乾燥した微生物は、インタクトな微生物に含まれる。

- 5 また、「直鎖低級アルコール」とは、炭素数1～8の直鎖アルコールをいう。特に、メタノール、エタノール、プロパノールが好適である。

「無溶媒系」とは、油脂を溶解するための溶媒を含まない意味であり、エステル化反応に用いられる直鎖低級アルコールは、本願明細書に言う溶媒ではない。

- 10 「微溶媒系」とは、油脂をエステル化反応に用いる直鎖低級アルコールに溶解させるために、補助的に溶媒が添加された系を意味する。油脂が直鎖低級アルコールに完全に溶解しない場合でも、反応は進行するため、必ずしも、溶媒を添加する必要もない。溶媒の添加により油脂が溶解され、反応速度が大きくなる可能性がある。

15

（微生物）

本発明の特徴の一つは、「インタクトな微生物」を使用することである。リパーゼを産生する微生物であれば、どのような微生物でも使用できる。再使用の面からは、固定化微生物が好ましい。インタクトな微生物が用いられる結果、従来細胞膜の透過性向上などの目的で行われていた溶媒（例えば、アルコール、アセトン、クロロホルムなど）による処理が不要となり、溶媒回収設備あるいは防爆設備が不要となり、製造コストも大きく低下できる。

- 20 リパーゼは、1，3-特異的であってもよく、非特異的であってもよい。脂肪酸エステルの製造の面からは、非特異的である方が好ましい。このようなリパーゼを生産する微生物であればどのような微生物でもよい。糸状菌、細菌、酵母等が例示される。
- 25

糸状菌としては、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、ガラクトミセス (*Galactomyces*) 属、ゲオトリカム (*Geotrichum*) 属、ムコール (*Mucor*) 属、フィコミセス (*Phycomyces*) 属、リゾムコール (*Rhizomucor*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、リゾプス (*Rhizopus*) 属等に属する微生物が挙げられる。

- 5 細菌としては、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、アルカリゲネス (*Alkaligenes*) 属等に属する細菌が挙げられる。

酵母としては、キャンディダ (*Candida*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、ピヒア (*Pichia*) 属、ロードトルラ (*Rhodotorula*) 属、ヤロウィア (*Yarrowia*) 属に属する酵母が挙げられる。

- 10 上記微生物が耐熱性であれば、反応温度を高くすることができるので、より好ましい。

- また、リパーゼ遺伝子が導入された組換え微生物を用いることも好ましい。この組換え微生物は、リパーゼが微生物体外へ分泌されない微生物であることが好ましい。従って、分泌に関与する配列が欠失した組換えリパーゼを発現し得る微生物であることが好ましい。ここで、「分泌に関与する配列」とは、いわゆるブレ配列 (シグナル配列) をいい、欠失とは、すべてのブレ配列 (シグナル配列) が欠失した場合、一部の欠失により分泌が起こらない場合、およびブレ配列が破壊されて (例えば、アミノ酸の置換、欠失、付加などにより) 分泌機能が破壊された場合などの、分泌が生じないようなすべての変異が含まれる。
- 20

- このような分泌に関与する配列が欠失した遺伝子は、既知のリパーゼ遺伝子を基にして、当業者が通常用いる遺伝子組換え技法を用いて作成される。従来、リパーゼは分泌されて発現すると考えられていたが、本発明者らが、初めて、遊離型の (すなわち、ブレ配列を有しない) リパーゼが微生物体内で発現され、蓄積されること、および、微生物の細胞内に存在するにもかかわらず、何らの微生物の処理も行わず、細胞内のリパーゼが脂肪酸ア
- 25

ルコールエステル合成に関与し得ることを見出して、本発明の一つを完成させたものである。

上記微生物は固定化されていることが、再利用の点から好ましい。固定化は、当業者が微生物に応じて、適宜選択する適切な方法で行われる。例えば、
5 包括法、物理的吸着法、担体への附着法等が挙げられるが、担体に微生物を吸着ないし附着させる方法が、作製が容易であるので、好ましい。

本発明において、「担体」とは、微生物を固定化することができる物質を意味し、好ましくは、水またはある特定の溶媒に対して不溶性の物質である。本発明に用いる担体の材質としては、例えば、ポリビニルアルコール、ポリ
10 ウレタンフォーム、ポリスチレンフォーム、ポリアクリルアミド、ポリビニルフォルマル樹脂多孔質体、シリコンフォーム、セルロース多孔質体、発泡セラミック等の発泡体あるいは樹脂が好ましい。多孔質体あるいは発泡体の開口部の大きさは、固定化する微生物によっても異なるが、細胞が十分に
15 入り込めて、増殖できる大きさが適当である。大腸菌、枯草菌などのバクテリアの場合は、約 $10\text{ }\mu\text{m}\sim 500\text{ }\mu\text{m}$ 、糸状菌、酵母などの場合は $50\text{ }\mu\text{m}\sim 1,000\text{ }\mu\text{m}$ が好適であるが、これに限定されない。

また、担体の形状は問わない。担体の強度、培養効率等を考慮すると、球状あるいは立方体状で、大きさは、球状の場合、直径が $2\text{ mm}\sim 50\text{ mm}$ 、立方体状の場合、 $2\text{ mm}\sim 50\text{ mm}$ 角が好ましい。

20 上記のように、微生物と担体とを混合して培養するだけで、微生物は担体に固定され、アセトン、アルコール等の処理を行うことなく、そのまま使用されるか、あるいは乾燥されて（すなわち、インタクトな固定化微生物として）使用される。

このようにして得られるインタクトな固定化微生物は、浮遊状態で反応に
25 用いられるか、カラム等に充填されて、いわゆるバイオリアクターとして用いることができ、連続的にあるいはバッチで繰り返し反応に用いることがで

きる。

(酵素)

- 本発明においては、酵素（リパーゼ）自体を用いることができる。リパーゼとしては、上記微生物に由来するリパーゼが挙げられ、市販のリパーゼも用いられる。例えば、ナガセ生化学工業（株）製の商品名リリパーゼA-1 OFG（リゾプス・ジャポニカス由来）、商品名SM酵素（セラチア・マルセセンス由来）、商品名リパーゼPなど；天野製菓（株）製の商品名リパーゼF（リゾプス・オリゼ由来）、商品名リパーゼL（キャンディダ・リボリティカ由来）など；および名糖産業（株）製のリパーゼ-OF（キャンディダ・ルゴサ由来）などが挙げられる。

担体としては、上記材質、形状のものが挙げられるが、多孔質担体の場合、その開口部は必ずしも上記の大きさとなくともよく、10 μ m以下であってもよい。

15 (油脂)

- 油脂としては、グリセリド、中でもトリグリセリドを多く含む油脂が好ましい。油脂としては、植物油脂、動物油脂、魚油、微生物が生産する油脂、これらの混合油脂、あるいはこれらの廃油が好ましく用いられる。植物油脂としては、大豆油、菜種油、パーム油、オリーブ油等が挙げられる。動物油脂としては、牛脂、豚脂、鯨油、羊脂等が挙げられる。魚油としては、イワシ油、マグロ油、イカ油等が挙げられる。微生物が生産する油脂としては、モルティエラ属（Mortierella）やシゾキトリウム属（Schizochytrium）等に属する微生物によって生産される油脂が挙げられる。本発明の方法では、反応液に水が含まれていても問題がないので、水分を多く含む廃油も好ましい原料の一つである。

(水の存在下におけるエステル合成反応)

本発明においては、水の存在下で、脂肪酸直鎖低級アルコールエステル合成反応を行う。一般に、リパーゼによる脂肪酸直鎖低級アルコールエステル合成反応において、水分はエステル分解反応が生じるので好ましくないと考えられていた。

他方で、油脂のうち、トリグリセリド（以下、TGと略することがある）と直鎖低級アルコールとから脂肪酸直鎖低級アルコールエステルを最も効率よく合成する場合には、理論的には、TG 1モル(mol)に対して、直鎖低級アルコールを3モル(mol)加える必要がある。しかし、直鎖低級アルコールがある濃度以上になると、リパーゼまたは微生物中のリパーゼを阻害ないし失活する傾向にある。

そこで、本発明者等は、これらを同時に解決すべく検討した結果、リパーゼ、あるいはインタクトな微生物を用いて、水の存在下、脂肪酸直鎖低級アルコールエステルの合成反応を行うことにより、上記2つの問題が一度に解決されることを見出し、本発明を完成させた。すなわち、水を添加することにより、リパーゼの不活性化あるいは不可逆的失活が防止できること、および水の存在下でも、合成された脂肪酸エステルが分解されないことを見出した。その結果、脂肪酸エステルが効率的に合成される。さらに、水の存在下、アルコールを分割添加することにより、脂肪酸エステルが効率よく合成されることも見出した。

水は、反応系全量に対して、0.3重量%以上含まれることが好ましく、約1～50重量%含まれることがより好ましく、約3～30重量%含まれることがさらに好ましい。

水を添加して反応を行う場合、直鎖低級アルコールの濃度は、用いるアルコールの種類によって適切な範囲が異なるが、要は、アルコールによる阻害が生じない程度であればよい。メタノールの場合は、メタノールと水との合

計量に対して30重量%以下とすることが好ましい。25重量%以下がより好ましく、20重量%以下がさらに好ましい。この場合、反応系に直鎖低級アルコールが油脂1モルに対して3モル以上存在しても、微生物のリパーゼは阻害されず、また不活性化もされない。従って、微生物はリサイクルできる。

水と直鎖低級アルコールとは、別々に加えてもよいが、適切な濃度を有する水溶液として、油脂（例えばTG）に加えてもよい。

また、本発明においては、直鎖低級アルコールを添加し、このアルコール濃度を、上記適切な濃度となるように維持しながら、反応物を回収し、生じる脂肪酸エステルとグリセリンとを分離（例えば静置分離）することにより、連続的に、脂肪酸エステル合成を行うこともできる。

さらに、別の方法として、直鎖低級アルコール阻害を回避するために、直鎖低級アルコールを分割添加することもできる。すなわち、リパーゼ阻害濃度よりも低い濃度となるように、直鎖低級アルコールを添加する。なお、「リパーゼ阻害濃度」とは、微生物中のリパーゼの活性が阻害され、あるいはリパーゼが不可逆的に失活する濃度をいう。

直鎖低級アルコールの分割添加の方法は、特に制限されない。バッチ式でもよく、連続式でもよい。バッチ式の場合、リパーゼ阻害濃度より低い直鎖低級アルコール濃度で反応を行い、ついで、この反応終了液に、直鎖低級アルコールを、リパーゼ阻害濃度よりも低い濃度となるように加えて、さらにエステル交換反応を行う方法（多段形式）でもよい。直鎖低級アルコールの濃度により、2バッチ（2段反応）で反応を終了させることもできるし、3バッチ（3段）またはそれ以上で反応を終了させてもよい。例えば、インタクトな固定化微生物を用い、直鎖低級アルコールとしてメタノールを用いる場合は、TG1モルに対して約2モルのメタノールでリパーゼ阻害が起こるように思われる（実施例1参照）ので、それ以下のメタノール濃度とする必

要がある。例えば、最初にTG 1モルに対してメタノールを1モル加えて第1段階の反応を行い、第一段階の反応が終了した後に、さらにTG 1モルに対してメタノールを1モル加えて第2段階の反応を行い、第2段階の反応終了後、さらにTG 1モルに対してメタノール1モル加えて第3段階の反応を行って、反応が完結する。

また、生じる脂肪酸低級アルコールあるいは消費されるアルコールの量をモニターしながら、直鎖低級アルコールが常にTG 1モルに対して1モル以下の濃度となるように、直鎖低級アルコールを滴下することも、分割添加の一態様である。

さらに、脂肪酸エステルによってリパーゼ阻害が解除されるので、予め、脂肪酸エステルと直鎖低級アルコールとを混合した溶液を分割添加してもよい。分割添加はバッチ式でも、連続式でもよい。添加する脂肪酸エステルは、油脂と直鎖低級アルコールとの反応により生じる脂肪酸エステルと同じでも良いし、異なってもよい。脂肪酸エステルは、反応開始時に、反応液の5～80重量%、好ましくは10～80重量%、より好ましくは、20～70重量%、最も好ましくは、30～50重量%となるように添加される。エステル合成反応により新たに脂肪酸エステルが生成するので、脂肪酸エステルの添加量は、阻害を解除できる範囲で、できるだけ少ない方がよい。

油脂と直鎖低級アルコールとインタクトな微生物との間のエステル交換反応は、一般的には、約5～80℃、好ましくは、約15～50℃、より好ましくは、約25～45℃で行われる。反応温度は用いる微生物により決定すればよく、例えば、耐熱性の微生物であれば、比較的高温で反応できる。

反応時間は、油脂と直鎖低級アルコールの組成と酵素量で決定される。

反応終了後、生じた脂肪酸エステルは、静置、遠心分離、膜分離、分子蒸留、精密蒸留等の分離操作の常法によりグリセリンと未反応のグリセリドとから分離され、回収される。

(実施例)

以下、実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明がこれらの実施例に限定されないことは言うまでもない。

5 (インタクトな固定化微生物および溶媒処理微生物の調製)

リパーゼ生産微生物として、リゾプス・オリゼ (*Rhizopus oryzae*) IF046 97を用いた。80℃以上の蒸留水にポテトデキストロースアガー (Difco 製) を39g/l、およびアガー (Difco製) を20g/l加えて攪拌しながら溶解し、pHを5.5に調整した後、試験管に5mlずつ加え、オート
10 クレーブで121℃、20分滅菌してスラントを作成し、このスラントに菌体を接種し、30℃、70時間培養した。

以下の組成：

	グルコース	3 g/l
	ポリペプトン	70 g/l
15	NaNO ₃	1 g/l
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g/l
	KH ₂ PO ₄	1 g/l
	pH	5.6

20 の培地100mlに6mm角のポリウレタンフォーム (ブリジストン社製：形式HR-50：以下、BSPという) 150個を入れ、BSPに培地を十分に馴染ませた後、500mlの坂口フラスコに入れ、オレイン酸を30g/l加え、オートクレーブで121℃、20分殺菌した。

殺菌後、35℃まで冷却した液体培地100ml当り、上記スラント1本分の孢子を接種し、振幅70mm、振盪数150rpm、35℃で90時間
25 振盪培養した。培養終了後、BSPに固定化された菌体 (以下、BSP固定化菌体という) を濾過により回収し、水で洗浄した。

得られたBSP固定化菌体から菌体が剥離しない程度に水分を除去し、48時間、室温で乾燥させて、インタクトな固定化された微生物を得た。他方で、BSP固定化菌体を、それぞれ、メタノール、エタノール、アセトン、およびイソプロピルアルコールを用いて、30℃で、30分、60分、および120分間処理し、溶媒処理固定化微生物とした。

(実施例1)

大豆油9.65gとメタノール0.35gの混合物(モル(mol)比1:1)10gおよび大豆油9.32gとメタノール0.68gの混合物(モル(mol)比1:2)10gに、それぞれ水を1g加えた反応液を準備した。この反応液にインタクトな固定化微生物あるいは溶媒処理固定化微生物を、それぞれ50個加えて、30℃、130rpmで振盪しながら20時間反応した。反応終了後、生じた脂肪酸エステルをガスクロマトグラフィー(GC)で定量した。GCは、トリカプリリンを内部標準として用い、以下の条件によった。

GC条件:

カラム:DB-5(J&W Scientific、10m×25mm)

初期カラム温度:150℃(0.5分)

昇温速度:10℃/分

最終温度:300℃(3分)

インジェクター温度:245℃

ディテクター温度:320℃

キャリアガス:ヘリウム(2.5cm/分)

スピリット比:1/100

結果を表1に示す。表中、変換率は、メタノールのメチルエステルへの変換率を意味する。

表 1

大豆油/MeOH	微生物 処理溶媒	処理時間(分)		
		30	60	120
		変換率(%)		
モル比=1:2	無処理	81	81	81
	メタノール	10	3	0
	エタノール	50	20	8
	アセトン	80	62	30
	iso-PrOH	69	65	41
モル比=1:1	無処理	100	100	100
	メタノール	5	5	5
	エタノール	48	30	12
	アセトン	80	64	43
	iso-PrOH	75	70	54

iso-PrOHは、イソプロピルアルコールを示す

- この結果は、大豆油とメタノールが1:1のモル比で添加された場合、反応が100%進行したのに対し、大豆油とメタノールが1:2のモル比で添加された場合、エステル合成反応が100%進行せず、リパーゼ活性が20%ほど阻害されることを示している。さらに、メタノール処理した場合、固定化微生物のリパーゼはほとんど失活することがわかり、エタノール処理では半分程度にリパーゼ活性が低下した。アセトン処理、イソプロピルアルコール処理では、処理時間の増加とともにリパーゼ活性の低下が見られた。このことから、リパーゼ生産微生物を溶媒処理することなく、そのまま乾燥しても、十分にリパーゼ活性（脂肪酸低級アルコールエステル合成活性）を有することがわかった。

(実施例2)

大豆油 9.65 g とメタノール 0.35 g の混合物 (モル(mol)比 1 : 1) 10 g を準備し、表 2 に記載の量の水を加えた反応液を準備した。それぞれの反応液にインタクトな固定化微生物、アセトン処理固定化微生物またはイソプロピルアルコール処理固定化微生物をそれぞれ 50 個添加して、30℃、130 振盪/分で振盪しながら、1 日反応させた。この反応液にメタノールを 0.31 g 添加してさらに 24 時間反応を行い (2 日目)、再度、メタノールを 0.31 g 添加してさらに 1 日反応させた (3 日目)。その後、さらに 3 日間 (合計 6 日間) 反応させた。結果を表 2 に示す。なお、表 2 の変換率は、大豆油を構成する脂肪酸のメチルエステル化率で表した。

表 2

固定化微生物	水(g)	1日	2日	3日	6日
インタクト (無処理)	0.3	19.2	25.8	46.1	69
	1.0	32.9	65.3	92.1	97.1
	3.0	30.5	66.8	98.0	98.8
アセトン処理	1.0	13.3	22.7	29.9	41.2
iso-PrOH処理	1.0	15.2	31.2	39.9	51.8

この結果は、水分が約 3～30 重量%存在しても、インタクトな固定化微生物では、ほぼ理論値に近いエステル合成反応が進行したことを示している。他方、従来必要とされていたアセトン処理あるいはイソプロピルアルコール処理などの溶媒処理を行った溶媒処理固定化微生物では、活性が安定せず、反応もインタクトな固定化微生物と比べて、かなり劣ることがわかった。

(実施例 3)

分泌に関与する配列が欠失した組換えリパーゼを発見し得る微生物を調製した。

分泌に関与する配列が欠失した組換えリパーゼをコードするプラスミドを

作成するための出発ベクターとしてプラスミド pWI3 を用いた。プラスミド pWI3 の作製方法は、(Kanai Tら、Appl. Microbiol. Biotechnol. 1996, 44 (6), 759-765に記載されている。図1にプラスミド pWI3 の制限酵素地図を示す。

- 5 まず、*R. oryzae* IF0 4697の染色体を常法により調製した。この染色体DNAから、pfuTurboポリメラーゼ (Stratagene社製 #600250) を用いるPCR法により、*R. oryzae*由来のリパーゼ (ROL) 遺伝子を増幅した。PCRに用いたプライマーは、Ics (5'-ctccggatccatggttctgtttctggttaaatctggatct-3' : 配列番号2) およびROLrvSalI (5'-cgatgtcgaactacaacagcttcc-3' : 配列番号3) であった。この2種の合成オリゴヌクレオチドを用いて増幅されるROL遺伝子は、分泌シグナルペプチドをコードしているブレ配列を持たず、プロ配列と成熟タンパク質領域の両方の遺伝子配列を有していた。この配列を配列番号1に示す。

- 15 PCR増幅により得られた配列 (ROL) を制限酵素BamHIおよびSalIで消化し、ROLのBamHI-SalI断片を精製した。

他方、プラスミド pWI3 をBgIIIおよびSalIで消化した後、上記ROLのBgIII-SalI断片を混合して、接続し、ROL遺伝子が正しく挿入されていることを確認した。得られたプラスミドをpWI3pmROL7 (図1参照) と命名した。

- 20 プラスミド pWI3pmROL7 を酵母*Saccharomyces cerevisiae* MT8-1 (MATa ura3-1 trp1-1 ade2-1 leu2-3,112 his3) に、酢酸リチウム法により形質転換し、SD-W選択培地寒天プレート (2%グルコース、0.67 yeast nitrogen base w/o amino acids、0.003%ロイシン、0.002%アデニン、0.002%ヒスチジン、0.002%ウラシル、2%寒天) で形質転換株を選択した。
- 25 得られた形質転換株*S. cerevisiae* (pWI3pmROL7) を、初発グルコース濃度0.5~8.0、2%のカザミノ酸を含有するSD-W液体培地に植菌し、坂口

フラスコで培養してリパーゼ遺伝子を発現させた。培養して得られた形質転換株をガラスビーズで破砕し、菌体内リパーゼを、リパーゼキットS（大日本製薬）を用いて測定した。比較として、菌体外にリパーゼを分泌する酵母（Takahashi S.ら、J. Fermentation and Bioengineering 86(2):164-168, 1998）を用いた（表3中、分泌型ROLと表記する）。また、コントロールとしてプラスミドpWI3を有する酵母を用いた。結果を表3に示す。

表 3

形質転換酵母	生育 (OD ₆₀₀)	菌体内リパーゼ 活性(IU/L)	菌体内リパーゼ 比活性(IU/L)
分泌抑制型 pWI3pmROL	7.49	350.6	46.81
control pWI3	7.59	0.00	0.00
分泌型 ROL	16.3	10.95	0.67

表3からわかるように、形質転換株*S. cerevisiae* (pWI3pmROL7) は、菌体内に多量のリパーゼを蓄積し、菌体内リパーゼの比活性は、分泌型の約70倍もあることがわかった。

得られた形質転換株*S. cerevisiae* (pWI3pmROL7) を以下のように培養して、固定化酵母を作成した。まず、前記SD-W液体培地100mlに6mm角のBSP（ブリジストン社製）150個を入れ、BSPに培地を十分に馴染ませた後、500mlの坂口フラスコに入れ、オレイン酸30g/lを加え、オートクレープで121℃、20分殺菌した。

35℃まで冷却した液体培地100mlに形質転換株*S. cerevisiae* (pWI3pmROL7) を接種し、30℃で24時間振盪培養した。培養終了後、BSPに固定化された酵母菌体（以下、BSP固定化酵母菌体という）を濾過により回収し、水で洗浄した。

得られたBSP固定化酵母菌体から菌体が剥離しない程度に水分を除去し、

48時間、室温で乾燥させて、インタクトなBSP固定化酵母菌体を得た。

大豆油9.65gとメタノール0.35gの混合物（モル(mol)比1:1)10gに、水を1g加えた反応液を準備し、この反応液にインタクトなBSP固定化酵母菌体を50個加えて、30℃、130rpmで振盪しながら20時間反応した。反応終了後、生じた脂肪酸エステルを、実施例1と同じ条件で、GCで定量した。

結果を図2に示す。図2の100時間目および300時間目の矢印は、それぞれ、メタノールを0.35g添加したことを示す。ME含量は、脂肪酸メチルエステルの含量を意味する。

この結果は、リパーゼを細胞内に発現する酵母を、全く溶媒処理することなく用いることにより十分に脂肪酸エステル化反応が進行することを示している。

(実施例4)

大豆油308.0gに、メタノール36.0g、水144.0gを混合した（反応系A）。この反応系Aの油脂とメタノールのモル比は1:3.2であり、メタノール濃度は、メタノールと水との合計量に対して20重量%であり、反応系の水分含量は29.5%であった。

他方、比較として、大豆油308.0gに、メタノール68.0g、水144.0gを混合した（反応系B）。この反応系Bの油脂とメタノールのモル比は1:6であり、メタノール濃度は、メタノールと水との合計量に対して32重量%であり、反応系の水分含量は27.7%であった。

BSPに固定した微生物をカラムの中段に詰めて固定化微生物層を設け、固定化微生物層の下に分離層を設け、分離層の上部から反応液を抜き出し、カラム上部から固定化微生物層に散布して、反応液を循環することにより、エステル化反応を進行させた。脂肪酸エステルは、実施例1と同様に測定し

た。

結果を図3に示す。図3の▲は反応系Aの第一バッチの反応であり、○は反応系Aの第2バッチの反応である。●は、反応系Bの第一バッチである。図3から明らかなように、メタノール濃度が低い反応系Aは、反応はほぼ9
5 0%以上進行し、2バッチ目でもリパーゼが失活することはなかった。他方、メタノール濃度が32重量%の反応系Bでは、50時間でリパーゼが失活した。

(実施例5)

10 大豆油308.0gに、メタノール68.0g、水200.0gを混合した。この反応系の油脂とメタノールのモル比は1:6であり、メタノール濃度は、メタノールと水との合計量に対して25.3重量%であり、反応系の水分含量は34.7重量%であった。この混合液を用いて、実施例4と同じ装置を用いて反応を行った。その結果、上記実施例4と異なり、メタノール
15 の濃度が低下したため、リパーゼは失活することなく、反応は進行した(結果は図示せず)。

(実施例6)

20 大豆油308.0gと水144.0gにキャンディグ・ルゴーサ由来のリパーゼを9.24g(大豆油に対して0.3重量%)添加し、攪拌槽に入れて、30℃、110rpmで攪拌した。これに、メタノールを12g添加し反応を開始した。8時間後、16時間後にそれぞれ、メタノールを12g添加し、反応を行った。添加したメタノールは合計で36.0gであり、最終的に、大豆油に対して3.2モルであった。脂肪酸エステルは、実施例1と
25 同様に測定した。2回実験を行い、24時間目の脂肪酸エステルの収率は、それぞれ、85%および91%であった。

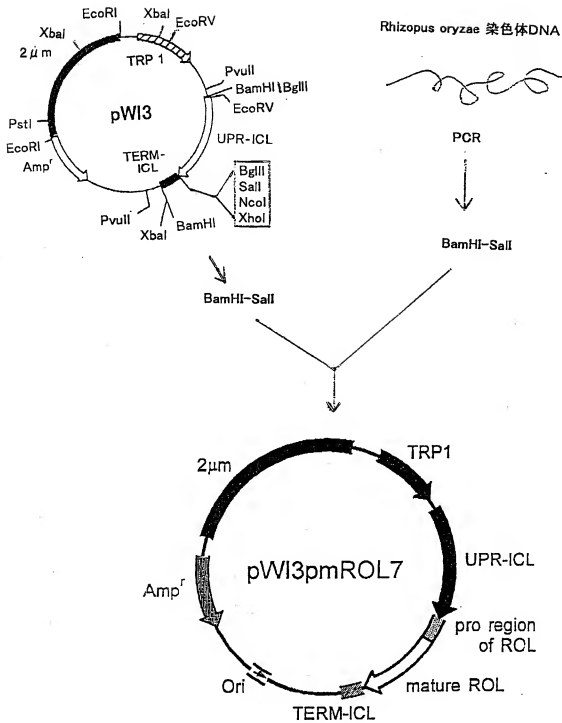
産業上の利用可能性

- 本発明のエステル合成方法は、リパーゼあるいは微生物をそのまま用い、無溶媒系で行われ、かつ水の存在下でも行われるので、操作が簡便であり、効率よく行われる。特に、水分を多く含む廃油の利用が可能になり、環境に廃棄される廃油のリサイクルが可能になると同時に、環境汚染の少ないバイオディーゼル燃料が提供される。

- さらに、酵素を単離する必要がないために、酵素の精製に要する工程、およびコストが不要となり、工程の簡略化とコストの低減につながる。また、従来用いられていた微生物の処理用および反応用の溶媒が不要となり、そのために要する溶媒回収、防爆設備等が不要となるとともに、コストも大幅に低減できる。

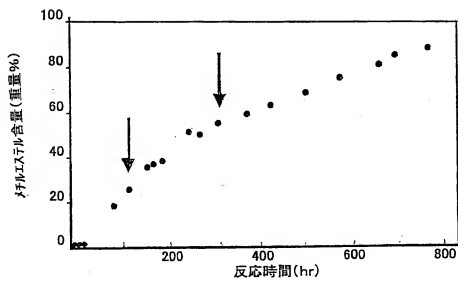
1 / 3

第1図



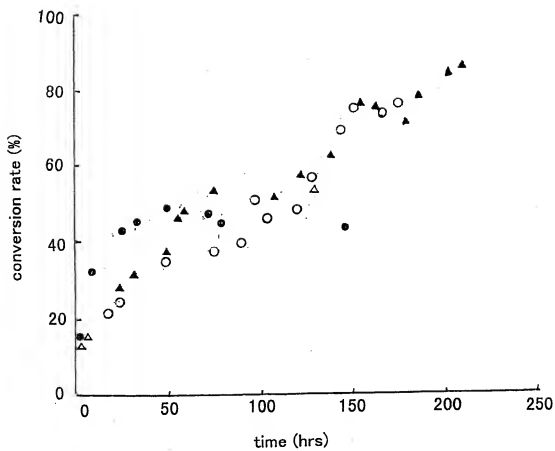
2 / 3

第2図



3 / 3

第3図



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Kansai Chemical Engineering Co., Ltd.

<120> Method for producing fatty acid-lower alcohol ester

<130> P2-99K02215

<160> 3

<210> 1

<211> 1104

<212> DNA

<213> Rhizopus oryzae IFO 4697

<400> 1

atg gtt cct gtt tct ggt aaa tct gga tct tcc aac acc gcc gtc tct	48
Met Val Pro Val Ser Gly Lys Ser Gly Ser Ser Asn Thr Ala Val Ser	
-98 -95 -90 -85	
gca tct gac aat gct gcc ctc cct cct ctc atc tcc agc cgt tgt gct	96
Ala Ser Asp Asn Ala Ala Leu Pro Pro Leu Ile Ser Ser Arg Cys Ala	
-80 -75 -70	
cct cct tct aac aag gga agt aaa agc gat ctc caa gct gaa cct tac	144
Pro Pro Ser Asn Lys Gly Ser Lys Ser Asp Leu Gln Ala Glu Pro Tyr	
-65 -60 -55	
aac atg caa aag aat aca gaa tgg tat gag tcc cat ggt ggc aac ctg	192
Asn Met Gln Lys Asn Thr Glu Trp Tyr Glu Ser His Gly Gly Asn Leu	
-50 -45 -40 -35	
aca tcc atc gga aag cgt gat gac aac ttg gtt ggt ggc atg act ttg	240
Thr Ser Ile Gly Lys Arg Asp Asp Asn Leu Val Gly Gly Met Thr Leu	
-30 -25 -20	
gac tta ccc agc gat gct cct cct atc agc ctc tct agc tct acc aac	288
Asp Leu Pro Ser Asp Ala Pro Pro Ile Ser Leu Ser Ser Thr Asn	
-15 -10 -5	

agc gcc tct gat ggt ggt aag gtt gtt gct gct act act gct cag atc	336
Ser Ala Ser Asp Gly Gly Lys Val Val Ala Ala Thr Thr Ala Gln Ile	
-1 1 5 10	
caa gag ttc acc aag tat gct ggt atc gct gcc act gcc tac tgt cgt	384
Gln Glu Phe Thr Lys Tyr Ala Gly Ile Ala Ala Thr Ala Tyr Cys Arg	
15 20 25 30	
tct gtt gtc cct ggt aac aag tgg gat tgt gtc caa tgt caa aag tgg	432
Ser Val Val Pro Gly Asn Lys Trp Asp Cys Val Gln Cys Gln Lys Trp	
35 40 45	
gtt cct gat ggc aag atc atc act acc ttt acc tcc ttg ctt tcc gat	480
Val Pro Asp Gly Lys Ile Ile Thr Thr Phe Thr Ser Leu Ser Asp	
50 55 60	
aca aat ggt tac gtc ttg aga agt gat aaa caa aag acc att tat ctt	528
Thr Asn Gly Tyr Val Leu Arg Ser Asp Lys Gln Lys Thr Ile Tyr Leu	
65 70 75	
gtt ttc cgt ggt acc aac tcc ttc aga agt gcc atc act gat atc gtc	576
Val Phe Arg Gly Thr Asn Ser Phe Arg Ser Ala Ile Thr Asp Ile Val	
80 85 90	
ttc aac ttt tct gac tac aag cct gtc aag ggc gcc aaa gtt cat gct	624
Phe Asn Phe Ser Asp Tyr Lys Pro Val Lys Gly Ala Lys Val His Ala	
95 100 105 110	
ggt ttc ctt tcc tct tat gag caa gtt gtc aat gac tat ttc cct gtc	672
Gly Phe Leu Ser Ser Tyr Glu Gln Val Val Asn Asp Tyr Phe Pro Val	
115 120 125	
gtc caa gaa caa ttg acc gcc cac cct act tat aag gtc atc gtt acc	720
Val Gln Glu Gln Leu Thr Ala His Pro Thr Tyr Lys Val Ile Val Thr	
130 135 140	
ggt cac tca ctc ggt ggt gca caa gct ttg ctt gcc ggt atg gat ctc	768
Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Gln Ala Leu Leu Ala Gly Met Asp Leu	

145	150	155	
tac caa cgt gaa cca aga ttg tct ccc aag aat ttg agc atc ttc act			816
Tyr Gln Arg Glu Pro Arg Leu Ser Pro Lys Asn Leu Ser Ile Phe Thr			
160	165	170	
gtc ggt ggt cct cgt gtt ggt aac ccc acc ttt gct tac tat gtt gaa			864
Val Gly Gly Pro Arg Val Gly Asn Pro Thr Phe Ala Tyr Tyr Val Glu			
175	180	185	190
tcc acc ggt atc cct ttc caa cgt acc gtt cac aag aga gat atc gtt			912
Ser Thr Gly Ile Pro Phe Gln Arg Thr Val His Lys Arg Asp Ile Val			
195	200	205	
cct cac gtt cct cct caa tcc ttc gga ttc ctt cat ccc ggt gtt gaa			960
Pro His Val Pro Pro Gln Ser Phe Gly Phe Leu His Pro Gly Val Glu			
210	215	220	
tct tgg atc aag tct ggt act tcc aac gtt caa atc tgt act tct gaa			1008
Ser Trp Ile Lys Ser Gly Thr Ser Asn Val Gln Ile Cys Thr Ser Glu			
225	250	255	
att gaa acc aag gat tgc agt aac tct atc gtt cct ttc acc tct atc			1056
Ile Glu Thr Lys Asp Cys Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Ile			
260	265	270	
ctt gac cac ttg agt tac ttt gat atc aac gaa gga agc tgt ttg taa			1104
Leu Asp His Leu Ser Tyr Phe Asp Ile Asn Glu Gly Ser Cys Leu			
275	280	285	289
<210> 2			
<211> 40			
<212> DNA			
<213> artificial			
<400> 2			
ctccggatcc atggttctctg tttctggttaa atctggatct			40
<210> 3			

<211> 25

<212> DNA

<213> artificial

<400> 3

cgatgtcgac ttacaacag ctcc

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/08185

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁷ C12P 7/64, C12N 1/19 // C12N 15/55, C12N 9/20, C10L 1/02, (C12P 7/64, C12R 1:845),
(C12P 7/64, C12R 1:865), (C12N 1/19, C12R 1:865)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.⁷ C12P 7/64, C12N 1/19

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
REGISTRY (STN), CA (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHIMADA, Y. et al., "Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized <i>Candida antarctica</i> ", J. Am. Oil Chem. Soc. (July 1999), Vol. 76, No. 7, pp. 789-793	1,4-7 2-3
X	KAIEDA, M. et al., "Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by <i>Rhizopus oryzae</i> lipase in a water-containing system without an organic solvent", Kouso Kougaku Kenkyukai Kouenkai Kouen Youshishu (29 October, 1999) Vol. 42nd, p. 64	1,4-7 2-3
Y	JP, 1-309689, A (Kanegafuchi Chem. Ind. Co., Ltd.), 14 December, 1989 (14.12.89) (Family: none)	1-7
Y	JP, 6-197777, A (KANSAI PAINT CO., LTD.), 19 July, 1994 (19.07.94) (Family: none)	1-7
Y	JP, 5-344896, A (KANSAI PAINT CO., LTD.), 27 December, 1993 (27.12.93) (Family: none)	1-7
P, Y	JP, 2000-270886, A (NAGASE & CO., LTD.), 03 October, 2000 (03.10.00) (Family: none)	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 February, 2001 (08.02.01)

Date of mailing of the international search report
20 February, 2001 (20.02.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/08185

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. Claims 1 to 7 relate to processes for producing a fatty acid ester which comprise reacting a lipase or an intact microorganism containing a lipase with a fat or an oil and a liner lower alcohol in a system containing little or no solvent in the presence of water.

2. Claim 8 relates to a recombinant microorganism having a DNA sequence capable of expressing a lipase with the deletion of a sequence relating to secretion and being capable of containing a lipase in its cell.

Since there is no matter common to all of the above-described claims, these two groups 1 and 2 of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest



The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.

A0030

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/08185

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,Y	KAIEDA, M. et al., "Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by <i>Rhizopus oryzae</i> lipase in a water-containing system without an organic solvent", J. Biosci. Bioeng. (25 December, 1999), Vol.88, No.6, pp.627-631	1-7
X	BEER, H. D. et al., "Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from <i>Rhizopus oryzae</i> ", Biochim. Biophys. Acta (1998) Vol.1399, Nos.2-3, pp.173-180	8
X	MINNING, S. et al., "Functional expression of <i>Rhizopus oryzae</i> lipase in <i>Pichia pastoris</i> : high-level production and some properties", J. Biotechnol. (1998) Vol.66, Nos.2-3, pp.147-156	8
Y	LIU, Y. et al., "Production of S-lactoylglutathione by high activity whole cell biocatalysts prepared by permeabilization of recombinant <i>saccharomyces cerevisiae</i> with alcohols", Biotechnol. Bioeng. (July 1999) Vol.64, No.1, pp.54-60	8
Y	LIU.Y. et al., " Kumikae Koubo no Saiboumaku Shori ni yoru Koukatsusei Whole Cell Biocatalysts no Sousei: Shori Jouken no Eikyuu," Kagaku Kougakukai Nenkai Kenkyu Happyou Kouen Youshishuu (February 1999), Vol.64th, p.225	8
Y	JP, 11-290078, A (Kansai Kagaku Kikai Seisaku K.K.), 26 October, 1999 (26.10.99) (Family: none)	8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))	
Int. Cl ¹ C12P 7/64, C12N 1/19 // C12N 15/55, C12N 9/20, C10L 1/02, (C12P 7/64, C12R 1:845), (C12P 7/64, C12R 1:865), (C12N 1/19, C12R 1:865)	
B. 調査を行った分野	
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))	
Int. Cl ¹ C12P 7/64, C12N 1/19	
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの	
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)	
REGISTRY (STN), CA (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST7748 (JOIS)	
C. 関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示
X Y	SHIMADA, Y. et al. "Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized Candida antarctica", J. Am. Oil Chem. Soc. (1999. Jul.) Vol. 76, No. 7, p. 789-793
X Y	KAIEDA, M. et al. "Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by Rhizopus oryzae lipase in a water-containing system without an organic solvent", 酵素工学会研究会講演会講演要旨集 (1999. Oct. 29) Vol. 42nd, p. 64
	関連する 請求の範囲の番号
	1, 4-7 2-3
	1, 4-7 2-3
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
08.02.01	20.02.01
国際調査機関の名称及び国名 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高堀 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 請求の範囲1-7は、微ないし無溶媒系において、水の存在下、リパーゼまたはリパーゼを含有するインタクトな微生物と油脂と直鎖低級アルコールとを反応させる脂肪酸エステルの製造方法に関するものである。
2. 請求の範囲8は、分泌に関与する配列を欠失したリパーゼを発見し得るDNA配列を有し、微生物体内にリパーゼを含有し得る組換え微生物に関するものである。

上記請求の範囲の全てに共通の事項はなく、上記1-2の発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 1-309689, A (鐘淵化学工業株式会社) 14. 12月. 1989 (14. 12. 89) (ファミリーなし)	1-7
Y	JP, 6-197777, A (関西ペイント株式会社) 19. 7月. 1994 (19. 07. 94) (ファミリーなし)	1-7
Y	JP, 5-344896, A (関西ペイント株式会社) 27. 12月. 1993 (27. 12. 93) (ファミリーなし)	1-7
P, Y	JP, 2000-270886, A (長瀬産業株式会社) 3. 10月. 2000 (03. 10. 00) (ファミリーなし)	1-7
P, Y	KAIEDA, M. et al. "Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by Rhizopus oryzae lipase in a water-containing system without an organic solvent", J. Biosci. Bioeng. (1999. Dec. 25) Vol. 88, No. 6, p. 627-631	1-7
X	BEER, H. D. et al. "Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from Rhizopus oryzae", Biochim. Biophys. Acta (1998) Vol. 1399, No. 2-3, p. 173-180	8
X	MINNING, S. et al. "Functional expression of Rhizopus oryzae lipase in Pichia pastoris: high-level production and some properties", J. Biotechnol. (1998) Vol. 66, No. 2-3, p. 147-156	8
Y	LIU, Y. et al. "Production of S-lactoylglutathione by high acti vity whole cell biocatalysts prepared by permeabilization of recombinant saccharomyces cerevisiae with alcohols", Biotechnol. Bioeng. (1999. Jul.) Vol. 64, No. 1, p. 54-60	8
Y	劉えん 他「組み換え酵母の細胞膜処理による高活性whole cell bi ocatalystsの創製：処理条件の影響」 化学工学会年会研究発表講演要旨集(1999. Feb.) Vol. 64th, p. 225	8
Y	JP, 11-290078, A (関西化学機械製作株式会社) 26. 10月. 1999 (26. 10. 99) (ファミリーなし)	8